

PCT

世界知的所有權機關  
國際事務局



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 4 C12N 9/02, 15/00	A1	(11) 国際公開番号 WO 90/01542
(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00811	(43) 国際公開日 1990年2月22日(22.02.90)	
(22) 国際出願日 1989年8月9日 (09. 08. 89)		
(30) 優先権データ 特願昭63-199295 1988年8月9日 (09. 08. 88) JP 特願昭63-204173 1988年8月17日 (17. 08. 88) JP	(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SB (欧州特許), US.	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) (JP/JP) 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP)	添付公開書類 国際検査報告書	
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 風見 潤 (KAZAMI, Jun) (JP/JP) 〒248 神奈川県鎌倉市津西2丁目1-20 Kanagawa, (JP) 中村春次 (NAKANURA, Haruji) (JP/JP) 〒254 神奈川県平塚市宮松町11-27 Kanagawa, (JP) 後藤俊夫 (GOTO, Toshio) (JP/JP) 〒454 愛知県名古屋市中川区八幡1丁目3-9 Aichi, (JP)		
(54) Title: LUCIFERASE, LUCIFERASE-CODING GENE, AND PROCESS FOR PREPARING LUCIFERASE (54) 発明の名称 ルシフェラーゼ、それをコードする遺伝子およびルシフェラーゼの生産方法	(57) Abstract	
Luciferase having the amino acid sequence of Fig. 1 and a gene coding it are disclosed. In addition, a recombinant vector DNA wherein the luciferase-coding gene is connected to the downstream portion of a promoter capable of expressing in each host cell, a transformant obtained by transforming each host cell by the vector DNA, and a process for preparing luciferase using such transformants are also disclosed.	<pre> 10          20          30          40          50          60 Met Lys Leu Ile Ile Leu Ser Ile Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Val Val Asn Cys Glu Asp ATG AAG CTA ATA ATT CTG TCT ATT ATA TTB GCC TAG TGT GTC ACA GTC AAC TGC CAG GAT     10      20      30      40      50      60  38          40 Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Ala Pro Ser Ser Thr Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu GCA TGT CCT GTC GAA GCT GAA GCA CGG TCA AGT ACA CCA ACA GTC CCA ACA TCT TGT GAA     78      88      98      108      118      120  58          60 Ala Lys Glu Glu Glu Cys Ile Asp Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser GCT AAA GAA GCA GAA TCT ATC GAT ACC TCC GCA ACA TGT AAA CGA GAC ATA CTA TCA TCA     130      140      150      160      170      180  78          80 Asp Gly Leu Cys Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg His Cys Glu Tyr Val Ile GAC GGA CTG TGT GAA ATT AAA/GCA CGG AMG ACA TGC TGT AGA ATG TGC CAA TAT GCA ATT     190      200      210      220      230      240  90          100 Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys Arg Phe Asn Phe GAA TGC AGA GTC GAA GCT GCT GGA TAT TTT AGA ACC TTT TAC GGC AAA AGA TTT ATT TTT     250      260      270      280      290      300  110         120 Glu Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr Lys Glu Gly Asp Trp Ser Val Thr CAG GAA CCT GCT GGT AAA TAT GTG CTG GCT CCA GGA ACC AMG GGT GGC GAC TGG TCT GTC ACC     310      320      330      340      350      360  130         140 Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly Glu Lys Cys Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu GTC ACC ATG GAG ATT CTA GAT GGA CAG AAC CGA GCT GTC CTG ACT AAC ACA ACA CTG GAG     370      380      390      400      410      420  150         160 Val Val Glu Asp Val Ile Asp Ile Thr Glu Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Glu GTA GTC GGA GAC CTA ATA GAC ATT ACT CAA GCT ACT GCA GAT CCT ATC ACA GTT AAC CGA     430      440      450      460      470      480 </pre>	

(57) 要約

本発明は、第1図のアミノ酸配列を有するルシフェラーゼ及びそれをコードする遺伝子を提供するものであり、さらに、本発明は各宿主細胞中で発現可能なプロモーターの下流に前記ルシフェラーゼをコードする遺伝子を連結してなる組換え体ベクターDNA、そのベクターDNAにより各宿主細胞を形質転換してなる形質転換体、及びそれらの形質転換体を用いたルシフェラーゼの生産方法を提供するものである。

情報としての用途のみ  
PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	ES スペイン	MG マダガスカル
AU オーストラリア	FI フィンランド	ML マリー
BB ベルバードス	FR フランス	MR モーリタニア
BE ベルギー	GA ガボン	MW マラウイ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NL オランダ
BG ブルガリア	HU ハンガリー	NO ノルウェー
BJ ベナン	IT イタリー	RO ルーマニア
BR ブラジル	JP 日本	SD スーダン
CA カナダ	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウェーデン
CF 中央アフリカ共和国	KR 大韓民国	SN セネガル
CG コンゴー	LI リヒテンシュタイン	SU ソビエト連邦
CH スイス	LK スリランカ	TD チャード
CM カメルーン	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
DE 西ドイツ	MC モナコ	US 米国
DK デンマーク		

## 明細書

## ルシフェラーゼ、それをコードする遺伝子およびルシフェラーゼの生産方法

## 技術分野

5 本発明は、生物発光反応を用いた分析法に有効な純化された酵素ルシフェラーゼ及びそれをコードする遺伝子に関する。さらに本発明は、前記遺伝子が挿入された新規組換え体ベクターDNA、該ベクターDNAを有する形質転換体、及び該形質転換体を用いたルシフェラーゼ  
10 の生産方法を提供する。

## 背景技術

ウミホタル (*Cypridina hilgendorfii*) は、日本沿岸に生息する海産甲殻類で、刺激を受けて海水中に青白い発光液を放出する。発光は基質であるルシフェリンを酵素であるルシフェラーゼにより酸化することによって起こり、ホタルや発光バクテリアの発光のように他の必須成分を必要としない非常に単純な発光系であり、微量分析法への利用が期待される。  
15

しかしながら、一般にルシフェリンは化学的に合成することによって大量に得ることができるが、ルシフェラーゼは酵素であるため化学合成ができず、大量に得ることは困難である。ウミホタルのルシフェラーゼの場合も同様で、充分に純化されたルシフェラーゼは得られておらず、海洋汚染の進行でウミホタル自身の採集量が激減したことと相まって、量的な供給が保証されていない。  
20  
25

## 2

それ故に、遺伝子組換え技術を利用した該酵素の大量生産法の確立が期待されてきた。

本発明は、高度に純化されたルシフェラーゼの化学合成法、もしくは遺伝子組換え法による合成を可能ならしめ、高純度の該蛋白質を大量に得るために、該蛋白質を特定する遺伝子配列を得、クローニングされた遺伝子配列を動物細胞、酵母、大腸菌等で発現することを可能にし、それらの細胞を用いて、高純度の該酵素を大量に得ることを目的とする。

10

## 発明の開示

本発明は第1図のアミノ酸配列を有するルシフェラーゼ、及びそれをコードする遺伝子、該遺伝子を含んでなる新規組換え体ベクターDNA、及び該ベクターDNAにより宿主細胞を形質転換してなる形質転換体、及び該形質転換体を用いたルシフェラーゼの生産方法である。

## 図面の簡単な説明

第1a図、第1b図、第1c図、第1d図は、ウミホタル由来のルシフェラーゼのcDNAの塩基配列及びアミノ酸配列を示す。各列の上段は、アミノ酸配列を示す。各列の下段はcDNAの塩基配列を示す。

20

第2図は、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードするcDNAを含む組換え体プラスミドpCL07の作製法と、その制限酵素地図を示す。

第3図は、動物細胞におけるウミホタル由来のルシフェラーゼの発現ベクターpSVLCL5の作製法を示し

25

たものである。

第4a図は、酵母におけるウミホタル由来のルシフェラーゼの発現ベクターpMFE3A、pMFE3B、

pMFE3C、pMFE3Dの制限酵素地図、第4b図

5 は、各々の発現ベクターにおける $\alpha$ フェロモン遺伝子／ルシフェラーゼcDNAの接続部位近傍の塩基配列、及びアミノ酸配列を示したものである。

第5図は、酵母におけるウミホタル由来のルシフェラーゼの発現ベクターpGL1の作製方法を示したもので

10 ある。

第6図は、大腸菌におけるウミホタル由来のルシフェラーゼの発現ベクターpMT-CLP、pMT-CLS、pMT-CLTの作製方法を示したものである。

#### 発明を実施するための最良の形態

15 本発明のルシフェラーゼは、第1図に示される1番目から555番目までの555個のアミノ酸配列からなる蛋白質、または、第1図に示されるアミノ酸配列のうち、

29番目のアミノ酸であるプロリンから始まる527個のアミノ酸配列からなる蛋白質、30番目のアミノ酸で

20 あるセリンから始まる526個のアミノ酸配列からなる蛋白質、31番目のアミノ酸であるセリンから始まる5

25個のアミノ酸配列からなる蛋白質、もしくは32番目のスレオニンから始まる524個のアミノ酸配列から

なる蛋白質である。さらに、本発明のルシフェラーゼは前記ルシフェラーゼと実質的に同等のルシフェラーゼ活

性が保持されているならば、前記アミノ酸配列の置換、欠失、挿入等から構成される蛋白質、すなわちルシフェラーゼ同効物も本発明に含まれる。

本発明の遺伝子は、上記ルシフェラーゼをコードする  
5 遺伝子であって、第1図の下段にDNA塩基配列で示し  
たものであるが、実質的に同等のルシフェラーゼ活性が  
保持されているならば、塩基配列の置換、欠失、挿入等  
から構成される塩基配列も本発明に含まれる。

本発明のルシフェラーゼをコードする遺伝子を得る方  
10 法を説明する。まず、ウミホタルをグアニジンチオシア  
ネート中で破碎した破碎液から全RNAを抽出し、オリ  
ゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーにより  
ボリA<sup>+</sup> RNAを精製する。このボリA<sup>+</sup> RNAを出発  
材料としてcDNAを合成後、λgt10にクローニン  
15 グしてcDNAライブラリーを作製する。

一方、ウミホタルより精製したルシフェラーゼ蛋白質  
のN末端近傍のアミノ酸配列、及びリジルエンドペプチ  
ダーゼ分解によって得られたオリゴペプチドのアミノ酸  
配列を決定し、それらに対応するヌクレオチド配列を有  
する数種類のオリゴヌクレオチドを化学合成し、上述の  
20 cDNAライブラリーのスクリーニングのためのプローブ  
とする用いる。

プローブハイブリダイゼーション法によりこれらのプローブ  
25 がハイブリッドを形成する組換え体の有する挿入  
遺伝子の塩基配列の解析を行い、ルシフェラーゼ蛋白質

のアミノ酸配列と一致すれば、ルシフェラーゼ・タンパクをコードする遺伝子の一部であると同定できる。

さらに、本発明は動物細胞、酵母、大腸菌に代表される宿主細胞中で各々発現可能なプロモーターの下流に各々上記DNAを連結してなる組換えベクターDNA、そのベクターDNAにより宿主細胞を形質転換してなる形質転換体、及びそれらの形質転換体を用いたルシフェラーゼの生産方法を提供するものである。

具体的には、上述のようにして得られたウミホタル由来のルシフェラーゼをコードするcDNAを、動物細胞、酵母、大腸菌中において各々安定に保持され、かつそれらの細胞中において発現可能なプロモーターを持つベクターDNAに連結し、本発明の組換え体ベクターDNAが得られる。

ここで、プロモーターとは、RNA合成酵素が認識結合してRNA合成を開始するための信号であり、その下流に位置するDNA配列がmRNAに転写される。したがって、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子がmRNAに転写されるためには、各々の細胞中で機能するプロモーターの下流に、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子が位置する必要がある。

すなわち、ベクターDNAに含まれるプロモーターの下流の適当な位置にその認識配列の存在する適当な制限酵素によりベクターDNAを切断し、上記のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含むDNAを連結、挿入した

ものが用いられる。

ここで使用するプロモーターは、各々の宿主細胞中で機能するものなら何でも良く、例えば動物細胞においては動物細胞遺伝子もしくは動物ウイルス遺伝子のプロモーター等があげられる。より具体的には、SV40の後期プロモーター、チミジンキナーゼ遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、サイトメガロウイルス遺伝子のプロモーター等があげられる。酵母においては、酵母遺伝子のプロモーター等が用いられる。例えば、酵母の抑制性酸性フォスファターゼ遺伝子(*P H O 5*)、ガラクトース代謝酵素遺伝子(*G A L 1*)、 $\alpha$ フェロモン遺伝子(*M F \alpha 1*)のプロモーター等が用いられる。大腸菌においては、大腸菌遺伝子、ファージ遺伝子のプロモーター等が用いられる。例えば、大腸菌ラクトース分解酵素の遺伝子(*I a c*)のプロモーター、*t r p*オペロンに由来するプロモーター、 $\lambda$ ファージのP<sub>L</sub>プロモーター等があげられる。また、合成*t a c*プロモーターなども使用できる。

本発明で用いるベクターDNAは、各々の細胞中で安定に保持され、その細胞中で機能するプロモーターを持つものなら何でも良い。例えば、動物細胞では、プラスミドベクター、ウイルスベクター等があげられるが、より具体的には、pSV2[SV40の初期プロモーターを持つ: J. Mol. Appl. Genet. U.S.A.、1、327(1982)]、pSVL(SV40の後期

プロモーターを持つ：ファルマシア社製）、等があげられる。酵母においては、pMF $\alpha$ 8 [ $\alpha$ フェロモン遺伝子 (MF $\alpha$ 1) のプロモーターを持つ: Gene, 3, 155 (1985)]、pAM85 [抑制性酸性fos  
5 ファターゼ遺伝子 (PHO5) のプロモーターを持つ:  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80,  
1 (1983)] 等があげられる。大腸菌においては、  
pMT-1 [trp オペロンのプロモーターを持つ発  
現ベクター pKM6 (特開昭61-247387号) 由  
10 来]、pUC18/pUC19 [Gene, 33, 10  
3 (1985)] 等があげられる。

宿主細胞において機能する蛋白質分泌のためのシグナル配列をコードする塩基配列の下流に、ルシフェラーゼ  
15 をコードするcDNAをつなぐことで、ルシフェラーゼを細胞外に生産させることができる。このシグナル配列に特に制限はなく、動物細胞においては、例えば、インターロイキン-2 (IL-2) のシグナル配列等があげられる。酵母においては、 $\alpha$ フェロモンのシグナル配列等があげられる。大腸菌の場合は、 $\beta$ -ラクタマーゼの  
20 シグナル配列等があげられる。細胞内に生産させる場合は、シグナル配列を連結する必要はない。

宿主細胞として大腸菌を用い、細胞内にルシフェラーゼを生産させる場合には、発現させたい遺伝子がコードされる領域の5'末端にメチオニンをコードする塩基配列である“ATG”を付加し、大腸菌中で機  
25

能するプロモーター及びSD配列の下流に連結する必要がある。ここでいうSD配列とは、リボソームがmRNA上に同配列を認識、結合して、その下流にある“ATG”よりタンパク合成を開始するための信号である。また、メチオニンを付加するのは、分泌タンパクをコードしている真核生物の遺伝子の多くは、分泌のためのシグナル配列の下流に本来のタンパクをコードしており、まずシグナル配列を含む形でポリペプチドの前駆体を合成し、このタンパクが分泌される過程でシグナル配列が切断除去されるため、最終的に生産されるタンパクのN末端にはタンパク合成の開始信号として必須であるメチオニンの信号が付いていない場合が多いためである。また、ウミホタルより精製した天然型のルシフェラーゼがセリン及びスレオニンの2種類のN末端を持つタンパクの混合物であること、また、多くの真核生物ではシグナル配列はアラニン-X-アラニン配列の次で切断され、ウミホタル・ルシフェラーゼの塩基配列より予想されるアミノ酸配列中にアラニン-グルタミン酸-アラニン-プロリンという配列が存在することから、本発明のベクターはN末端領域に関して、メチオニンの下流にプロリン、セリン、またはスレオニンから始まるペプチドをコードする3種類の発現ベクターが用いられる。

前記各々の組換え体ベクターDNAにより動物細胞、酵母、大腸菌に代表される宿主細胞を各々形質転換した形質転換体とは、前記組換え体ベクターDNAを各々の

宿主細胞に導入することによって得られる。

本発明で使用される動物細胞としては特に制限はなく、

例えば、COS-1細胞（アフリカミドリザル腎臓由来

SV40形質転換細胞）、CHO細胞（チャイニーズハ

ムスター卵巣由来）等があげられ、好ましくはCOS-

1 細胞が用いられる。本発明において使用される酵母と

しては特に制限はなく、例えば、*Saccharomyces cerev-*

*isiae*、*Shizosaccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*等

があげられる。本発明において使用される大腸菌に特に

5 制限はなく、例えば、HB101、JM109等があげ

られる。

組換え体ベクターDNAを宿主細胞中に導入する方法

に特に制限はないが、例えば、宿主細胞が動物細胞の場

合は、DEAE-デキストラン法 [Mol. Cell.

15 Biol.、5、1188 (1985)]、カルシウム

-リン酸共沈法 [Cell、14、725 (1978)]、

電気穿孔法 [EMBO J.、1、841 (1982)]

等があげられる。中でも、DEAE-デキストラン法が

好ましく用いられる。宿主細胞が酵母の場合は、プロト

20 プラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci.

USA、75、1929 (1978)] が好ましく用い

られる。また、宿主細胞が大腸菌の場合は、好ましくは

塩化カルシウム法 [J. Mol. Biol.、53、1

54 (1970)] が用いられる。

25 このようにして組換え体ベクターDNAを動物細胞、

酵母、大腸菌に代表される宿主細胞中に各々導入することにより、ウミホタル由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含むDNAをベクターDNAに挿入した新規な組換え体ベクターDNA、さらにルシフェラーゼ生産能を有する形質転換体を得ることができる。

上記形質転換体を各々培地に培養し、培養物よりルシフェラーゼを得ることができる。培地としては、各々の培養に用いられるものであれば何でも良く、例えば、動物細胞の場合はダルベッコ変法イーグル培地等があげられ、酵母ではYEPD培地(20g/l トリプトン/10g/l 酵母エキス/20g/ml グルコース)等があげられ、大腸菌ではL培地(10g/l トリプトン/5g/l 酵母エキス/10g/l 塩化ナトリウム)等があげられる。

培養温度は各々の細胞が生育できる温度であれば何度でも良いが、例えば15~45°Cが好ましく、さらに好ましくは動物細胞、大腸菌では25~40°C、より好ましくは30~37°Cである。酵母では15~40°C、より好ましくは20~30°Cである。培養時間にも特に制限はないが、通常1~10日間、好ましくは動物細胞、酵母では3~7日間、大腸菌では1~3日間である。

プロモーターがその発現に適当な誘導を必要とする場合、例えば、動物細胞におけるメタロチオネイン遺伝子のプロモーター、酵母における抑制性酸性fosファターゼ遺伝子のプロモーター、大腸菌における $t_{rp}$ プロ

ロモーター等を用いる場合では適当な誘導物質を加える、  
適当な物質を除く、培養温度を変化させる、紫外線等を  
照射する等、各々のプロモーターに応じた手段により、  
培養中にプロモーターの発現に誘導をかけることができる。  
5 具体的には、大腸菌において *trp* プロモーター  
を使用した場合、*trp* オペロンの誘導物質である I  
AA (インドールアクリル酸) を培地に添加することに  
より、プロモーターの発現を誘導できる。

この際に、非誘導条件下で産生される微量のタンパク  
10 の存在が細胞の増殖等に悪影響を与える場合には、非誘  
導下ではプロモーターの発現をできるだけ抑制しておく  
ことが好ましい。例えば、非誘導下では完全に発現の抑  
制されるプロモーターを用いる、プロモーターの抑制遺  
伝子と組み合わせる等があげられる。具体的には例えば、  
15 *trp* プロモーターの場合、*trp* オペロンの抑制  
遺伝子を同一プラスミド上に持つ組換えプラスミドを用  
いることが好ましい。この抑制方法としては、トリプト  
ファン リプレッサー遺伝子 (*trpR*) [Nucl -  
eic Acids Res., 8, 1552 (198  
20 0)] が用いられる。これらとは別に、前述のように、  
生産されるタンパクを細胞外に分泌させる方法を用いる  
ことも可能である。

培養物は、適当な方法、例えば遠心分離等により培養  
上清と細胞とに分け、その培養上清もしくは細胞抽出液  
25 中のルシフェラーゼ活性をルミノメーター等を用いて検

出する。この培養上清もしくは細胞抽出液はそのままで粗酵素液として使用可能であるが、必要により、例えばF. I. Tsujiの方法 [Methods in Enzymol.、57、364 (1978)] 記載の方法により精製して、純化されたルシフェラーゼを得ることができる。

### 実施例

以下、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明する。

#### 実施例1

##### 10 cDNAライブラリーの作製

千葉県館山湾内で採集後、凍結保存したウミホタル5gを6M グアニジン チオシアネート／5mM クエン酸ナトリウム(pH 7.0)／0.5% ザルコシン酸ナトリウム溶液75mlに懸濁し、ポリトロンホモジナイザー(キネマティカ社製)で破碎した。塩化リチウム溶液(アマシャム社製キット)を加え、塩化リチウム共沈法によって約600μgのRNAを得た。このうち300μgのRNAをオリゴ(dT)セルローカラム(コラボレイティブ リサーチ社製)クロマトグラフィーによって精製し、約15μgのポリ(A)<sup>+</sup> RNAを得た。このうち2μgからcDNA合成キット(ライフ テクノロジーズ社製)を用いて1μgの2本鎖DNAを得た。このうちの0.15μgをEcoRI メチラーゼで処理してEcoRI切断部位を保護し、T4 DNA リガーゼを用いてEcoRI リンカーを結合した。さら

に、EcoRIで処理し、両末端をEcoRI切断部位に変換した。このDNAをT4 DNAリガーゼを使ってλgt10のEcoRI部位に挿入した後、in vitro パッケージングによりファージパーティクル中に導入した。これを大腸菌NM514に形質導入し、 $1 \times 10^6$  PFUのcDNAライブラリーを得た。

## 実施例2

### オリゴヌクレオチド・プローブの作製

F. I. Tsujiの方法 [Methods in Enzymol.、57、364 (1978)] で精製したウミホタル・ルシフェラーゼ $100\text{ }\mu\text{g}$ を凍結乾燥した後、 $100\text{ }\mu\text{l}$ の8M 尿素/ $0.1\text{ M}$  トリス塩酸(pH 7.6)/ $0.14\text{ M}$  2-メルカプトエタノールに溶解して、 $37^\circ\text{C}$ で3時間保温して-SH基をピリジルエチル化した。これに $200\text{ }\mu\text{l}$ の $0.11\text{ M}$  トリス塩酸(pH 9.0)、 $1\text{ }\mu\text{l}$ の2-メチルメルカプトエタノール、 $1\text{ }\mu\text{l}$ の $2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  リジルエンドペプチダーゼ(和光純薬社製)を加えて、 $37^\circ\text{C}$ で1時間消化した。これをVYDAC 218 TP54 (C<sub>18</sub>) (VYDAC社製)のHPLCにかけ、オリゴペプチドを分離した。得られたオリゴペプチドのうち13個について、アミノ酸シークエンサー470A (アプライドバイオシステムズ社製)を用いてN末端のアミノ酸配列を解析したところ、以下の13個のアミノ酸配列を得た。

14

## フラグメント 7 - 1

1 5 10

Thr-Cys-Gly-Ile-Cys-Gly-Asn-Tyr-Asn-Gln

## 5 フラグメント 7 - 2

1 5 10

Glu-Gly-Glu-Cys-Ile-Asp-Thr-Arg-Cys-Ala-

11 13

10 Thr-Cys-Lys

## フラグメント 12 - 1

1 5 10

Cys-Asn-Val-Cys-Tyr-Lys-Pro-Asp-Arg-Ile-

15

11

Ala

## フラグメント 12 - 2

20 1 5 7

Val-Ser-His-Arg-Asp-( )-Glu

25

15

## フラグメント 1 3

1 5 10

Ala-Arg-Tyr-Gln-Phe-Gln-Gly-Pro-Met-Lys  
(Cys)

5

## フラグメント 1 8

1 5 9

Arg-Phe-Asn-Phe-Gln-Glu-Pro-Gly-Lys

10

## フラグメント 2 1

1 5 10

Arg-Asp-Ile-Leu-Ser-Asp-Gly-Leu-Cys-Glu-

11 15

15

Asn-Lys-Pro-Gly-Lys

## フラグメント 2 3

1 5 10

Gly-Gln-Gln-Gly-Phe-Cys-Asp-His-Ala-Trp-

20

11 13

Glu-Phe-Lys

25

16

## フラグメント 27

1

5

10

Glu-Phe-Asp-Gly-Cys-Pro-Phe-Tyr-Gly-Asn-

5

11

15

18

Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Tyr-Cys-Lys

## フラグメント 38

1

5

10

10 Gly-Gly-Asp-( )-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Met-

11

15

17

Glu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gln-Lys

15

## フラグメント 40

1

5

10

His-Val-Leu-Phe-Asp-Tyr-Val-Glu-Thr-Cys-

11

15

20

20 Ala-Ala-Pro-Glu-Thr-Arg-Gly-Thr-Cys-Val-

21

25

30

Leu-Ser-Gly-His-Thr-Phe-Tyr-Asp-Thr-Phe

17

## フラグメント 47

1

5

10

Glu-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Asp-Cys-Tyr-( )-

5

11

15 16

Asn-Thr-( )-Asp-Val-Lys

## フラグメント 50

1

5

10

10 ( )-Leu-Met-Glu-Pro-Tyr-Arg-Ala-Val-Cys-

11

15

20

( )-Asn-Asn-Ile-Asn-Phe-Tyr-Tyr-Thr

15 次に上記の 13 種のアミノ酸配列のうち下記の 5 種に  
対するオリゴヌクレオチドを DNA 合成装置（アプライ  
ド バイオシステムズ社製）を用いて作製した。なお塩  
基配列中の I は、デオキシイノシンを示す。

20

25

18

プローブ I (フラグメント 27 の 1~6 番のアミノ酸配列に対応)

Glu-Phe-Asp-Gly-Cys-Pro

GAA TTT GAT GGT TGT CCT

5

	G	C	C	C	C	C
			A		A	
			G		G	

3'-CTT AAA CTA CCI ACA GG-5'

10

C	G	G	G
---	---	---	---

プローブ II (フラグメント 23 の 6~10 番のアミノ酸配列に対応)

Cys-Asp-His-Ala-Trp

TGT GAT CAT GCT TGG

15

C	C	C	C
		A	
			G

3'-ACA CTA GTA CGI ACC-5'

20

G	G	G
---	---	---

19

プローブIII（フラグメント47の4～9番のアミノ酸配列に対応）

Met-Ala-Ala-Asp-Cys-Tyr

ATG GCT GCT GAT TGT TAT

5                   C    C    C    C    C  
                      A    A  
                      G    G

10                  3'-TAC CGI CGI CTA ACA AT-5'  
                      G    G

プローブIV（フラグメント50の3～7番のアミノ酸配列に対応）

15                  Met-Glu-Pro-Tyr-Arg

ATG GAA CCT TAT CGT

                    G    C    C    C  
                      A           A  
                      G           G  
                      AGA  
                      G

25                  3'-TAC CTT GGI ATA TC-5'

                    C           G G

20

プローブV(フラグメント13の1~10番のアミノ酸配列に対応)

Ala-Arg-Tyr-Gln-Phe-Gln-Gly-Pro-Met-Lys

5	GCT CGT TAT CAA TTT CAA GGT CCT ATG AAA
	C C C G C G C C G
	A A A A
	G G G G
	AGA
10	G

3'-CGI GCI ATA GTT AAA GTT CCI GGI TAC TTT-5'
T G C G C

15

以上の5種のオリゴヌクレオチド各々1 $\mu$ gを、10 $\mu$ lの50mMトリス塩酸(pH 7.6)/10mM塩化マグネシウム/5mMジチオスレイトール/1mMスペルミジン/100mM塩化カリウムに溶解し、5 $\mu$ lの[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP(3000Ci/mmol;アマシャム社製)、85 $\mu$ lの蒸留水、2 $\mu$ lのT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)を添加して、37°Cで25時間反応して $^{32}$ P標識した。

## 実施例3

プラークハイブリダイゼーション法によるcDNAライ  
イブライリーのスクリーニング

実施例1で作製したcDNAライブライリーを用いて、  
5 50枚の寒天プレートに1枚当たり約1万個のプラーク  
を出現させた。このプラークをナイロン・メンブレンに  
移し取り、0.5M 水酸化ナトリウム／1.5M 塩  
化ナトリウム溶液中でDNAを変性させた後、0.5M  
トリス塩酸(pH 7.0)／1.5M 塩化ナトリウム溶液中  
10 で中和した。このメンブランを80°Cで2時間保温して、  
ファージDNAをメンブラン上に固定した後、50mM  
リン酸ナトリウム(pH 7.4)／0.75M 塩化ナトリウ  
ム／5×デンハルト溶液(0.1% 牛血清アルブミン  
／0.1% フィコール／0.1% ポリビニルピロリ  
ドン)／5mM EDTA／0.1% SDS／100  
15 μg/ml 変性サケ精子DNA溶液中で45°Cで2時  
間保温してプレハイブリダイゼーションを行った。

次に、新たな同溶液中にメンブランを移し、5μCi  
／mlとなるように実施例2で標識したオリゴヌクレオ  
20 チドプローブVを添加して、45°Cで一夜保温してハイ  
ブリダイゼーションを行った。約16時間後、6×SSC [90mM クエン酸ナトリウム(pH 7.0)／0.9M  
塩化ナトリウム]／0.1% SDSを用いて室温下で  
30分間ずつ2回、次に45°Cで30分間ずつ2回メン  
25 ブランの洗浄を行った。このメンブランを風乾した後、

X-O M A T<sup>TM</sup> AR フィルム（コダック社製）を用いて、  
-70°C、48時間オートラジオグラフィーを行った。

フィルムを現像し、32個の陽性クローンを得た。寒天プレート上のこれらの陽性クローンよりファージを増殖させ、ファージDNAを精製した。DNAは-20°C

5 で保存した。

#### 実施例4

##### ルシフェラーゼ蛋白質と遺伝子の1次構造の比較

実施例3で得られた32個の陽性クローンのうち、最大の約1900塩基対の挿入断片を含むクローンλCL  
10 07より挿入断片を制限酵素EcoRIで切り出し、プラスマドpUC18にサブクローニングし、組換え体プラスマドpCL07を作製した（第2図）。この1.9  
15 kbのEcoRI断片の塩基配列の決定は、通常のジデオキシ法を用いて行った。決定された塩基配列を第1図に示す。

得られた遺伝子の情報と、実施例2で得られた蛋白質の情報を比較することにより、第1表に示すように蛋白質と遺伝子の1次構造を対応させることができた。その結果、第1図に示すようにウミホタル由来のルシフェラーゼの遺伝子の塩基配列が特定され、また該蛋白質のアミノ酸配列を規定することができた。

第1表. アミノ酸配列と遺伝子の1次構造との対応(その1)

	アミノ酸配列の解析の結果	遺伝子1次構造との対応
	フラグメント7-1 Thr-Cys-Gly-Ile-Cys-Gly-Asn-Tyr-Asn-Gln	Thr-Cys-Gly-Ile-Cys-Gly-Asn-Tyr-Asn-Gln ACA TGC GGC ATA TGT GGT AAC TAT AAT CAA
5	フラグメント7-2 Glu-Gly-Glu-Cys-Ile-Asp-Thr-Arg-Cys-Ala- Thr-Cys-Lys	Glu-Gly-Glu-Cys-Ile-Asp-Thr-Arg-Cys-Ala- GAA GGA GAA TGT ATC GAT ACC AGA TGC GCA ACA TGT AAA
10	フラグメント12-1 Cys-Asn-Val-Cys-Tyr-Lys-Pro-Asp-Arg-Ile- Ala	Cys-Asn-Val-Cys-Tyr-Lys-Pro-Asp-Arg-Ile- TGT AAT GTC TGC TAC AAG CCT GAC CGT ATT Ala GCA
15	フラグメント12-2 Val-Ser-His-Arg-Asp-( )-Glu	Val-Ser-His-Arg-Asp-( )-Glu GTT TCA CAT AGA GAT GTT GAG
20	フラグメント13 Ala-Arg-Tyr-Gln-Phe-Gln-Gly-Pro-Met-Lys Arg-Asp-Ile-Leu-Ser-Asp-Gly-Leu-Cys-Glu- Asn-Lys-Pro-Gly-Lys	Ala-Arg-Tyr-Gln-Phe-Gln-Gly-Pro-Met-Lys (Cys) GCC AGA TAT CAA TTC CAG GGC CCA TGC AAA Arg-Asp-Ile-Leu-Ser-Asp-Gly-Leu-Cys-Glu- CCA GAC ATA CTA TCA GAC GGA CTG TGT GAA Asn-Lys-Pro-Gly-Lys AAT AAA CCA GGG AAG
25	フラグメント23 Gly-Gln-Gln-Gly-Phe-Cys-Asp-His-Ala-Trp- Glu-Phe-Lys	Gly-Gln-Gln-Gly-Phe-Cys-Asp-His-Ala-Trp- GGA CAG CAA GGA TTC TGT GAC CAT GCT TGG Glu-Phe-Lys GAG TTC AAA

第1表. アミノ酸配列と遺伝子の1次構造との対応(その2)

	アミノ酸配列の解析の結果	遺伝子1次構造との対応
5	フラグメント27 Glu-Phe-Asp-Gly-Cys-Pro-Phe-Tyr-Gly-Asn-	Glu-Phe-Asp-Gly-Cys-Pro-Phe-Tyr-Gly-Asn- GAG TTC GAC GGC TGC CCA TTC TAC GGG AAT
	Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Tyr-Cys-Lys	Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Tyr-Cys-Lys CCT TCT GAT ATC GAA TAC TGC AAA
10	フラグメント38 Gly-Gly-Asp-( )-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Met-	Gly-Gly-Asp-( )-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Met- GGT GGC GAC TGG TCT GTA ACC CTC ACC ATG
	Glu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gln-Lys	Glu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gln-Lys GAG AAT CTA GAT GGA CAG AAG
15	フラグメント40 His-Val-Leu-Phe-Asp-Tyr-Val-Glu-Thr-Cys-	His-Val-Leu-Phe-Asp-Tyr-Val-Glu-Thr-Cys- CAC GTC CTT TTC GAC TAT GTT GAG ACA TGC
	Ala-Ala-Pro-Glu-Thr-Arg-Gly-Thr-Cys-Val-	Ala-Ala-Pro-Glu-Thr-Arg-Gly-Thr-Cys-Val- GCT GCA CCG GAA ACG AGA GGA ACG TGT GTI
	Leu-Ser-Gly-His-Thr-Phe-Tyr-Asp-Thr-Phe	Leu-Ser-Gly-His-Thr-Phe-Tyr-Asp-Thr-Phe TTA TCA GGA CAT ACT TTC TAT GAC ACA TTC
20	フラグメント47 Glu-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Asp-Cys-Tyr-( )-	Glu-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Asp-Cys-Tyr-( )- GAG CTT CTG ATG GCC GCA GAC TGT TAC TGG
	Asn-Thr-( )-Asp-Val-Lys	Asn-Thr-( )-Asp-Val-Lys AAC ACA TGG GAT GTA AAG
25	フラグメント50 ( )-Leu-Met-Glu-Pro-Tyr-Arg-Ala-Val-Cys-	( )-Leu-Met-Glu-Pro-Tyr-Arg-Ala-Val-Cys- GGT CTC ATG GAG CCA TAC AGA GCT GTA TGT
	( )-Asn-Asn-Ile-Asn-Phe-Tyr-Tyr-Tyr-Thr	( )-Asn-Asn-Ile-Asn-Phe-Tyr-Tyr-Tyr-Thr CGT AAC AAT ATC AAC TTC TAC TAT TAC ACT

## 実施例5

SV40後期プロモーターを有する発現ベクターpSVLへのルシフェラーゼcDNAの挿入

実施例4で得られたウミホタル由来のルシフェラーゼ  
5 をコードする前記の1. 9 kbのEcoRI断片1 μg  
に各々1. 5 mMのdATP, dTTP, dCTP及び  
dTTPの存在下に、5ユニットの大腸菌DNAポリ  
メラーゼI ラージ フラグメント（宝酒造社製）を  
作用させ、末端を修復した。また、ベクターのpSVL  
10 （SV40後期プロモーターを持つ発現ベクター：ファ  
ルマシア社製）は、制限酵素SmaIにより分解した。

ついで末端を修復した1. 9 kb断片(0. 3 μg)とpSVLのSmaI分解物(0. 1 μg)とをT4  
DNAリガーゼによって結合し、その反応液を用いて  
15 大腸菌HB101コンピテント細胞（宝酒造社製）の形質転換を行い、この1. 9 kb断片の組み込まれた組換え体プラスミドを得、pSVLCL5と命名した（第3  
図）。

## 実施例6

COS-1細胞によるウミホタル由来のルシフェラーゼの生産

実施例5において作製した発現ベクターpSVLCL5(10 μg)を、COS-1細胞にDEAE-デキストラン法[Mol. Cell. Biol.、5、118  
25 8(1985)]を用いて導入した。また、コントロー

ルとして pSVL (10 μg) を同様にして COS - 1 細胞に導入した。

これらの細胞を 25 cm<sup>2</sup> の培養フラスコ中で、 10 % 牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地（日本水製薬社製）10 ml を用いて 5 % CO<sub>2</sub> の存在下、 37 °C で 5 日間培養した。培養途中及び培養終了後、 培養液 1 ml を採取し、 3,000 r.p.m.、 10 分間、 4 °C で遠心して、 その上清を集め、 培養上清とした。

また、 培養終了後、 細胞はトリプシン処理によって培養フラスコからはがした後、 1 ml の PBS (-) (日本水製薬社製) で洗浄し、 3,000 r.p.m.、 10 分間、 4 °C で遠心し上清を捨てた。これをさらに 2 回繰り返し、 200 μl の PBS (-) に懸濁した。凍結融解を 3 回繰り返し、 細胞抽出液とした。

#### 15 実施例 7

##### 動物細胞により生産されたルシフェラーゼの活性測定

実施例 6 に示した培養上清中のルシフェラーゼ活性の測定は、 下記の方法によって行い、 その結果を第 2 表に示した。すなわち、 30 μl の培養上清に 270 μl の測定用緩衝液 [100 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0) / 200 mM 塩化ナトリウム] を混合した。2 μl の 33 μM ウミホタル・ルシフェリンを混合し、 発生するフォトン数を直ちにルミノメーター (Lumac L 2010) を用いて 30 秒間計測した。発光強度は 1 秒当たりの平均フォトン数として示した。コントロールと

してpSVLを導入したCOS-1細胞の培養上清についても同様にして発生するフォトン数を計測した。

実施例6に示した細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性は、下記に記載した方法により行い、その結果も第2表に示した。すなわち実施例6で作製した細胞画分の10μlを290μlの上記測定用緩衝液と混合し、さらに2μlの33μMウミホタル・ルシフェリンを混合し、培養上清の場合と同様にしてルシフェラーゼ活性を測定した。

10

第2表

15	プラスミド	ルシフェラーゼ活性 ( $\times 10^5$ cps/ml)					
		細胞外					細胞内
		24時間	48時間	72時間	96時間	120時間	
	(a) pSVLCL5 (No. 1)	2.2	4.0	4.3	4.6	5.2	1.2
	(b) pSVLCL5 (No. 2)	2.3	5.8	8.3	9.0	10.5	3.0
	(c) pSVLCL5 (No. 3)	2.1	3.1	3.8	4.1	5.5	0.8
20	(d) pSVLCL5 (No. 4)	2.3	4.0	5.5	5.7	6.7	1.4
	(e) pSVL (コントロール)	2.0	2.5	2.3	2.3	2.1	0.2

## 実施例 8

酵母発現ベクター用オリゴヌクレオチドの合成とアニーリング

(1) ウミホタルより精製した天然型のルシフェラーゼが、第1図に示したアミノ酸配列の第31番目のアミノ酸であるセリンと第32番目のアミノ酸であるスレオニンのN末端を持つ2種類のペプチドの混合物であること、(2) cDNAより推定されるルシフェラーゼのアミノ酸配列のN末端に、タンパクの分泌のためのシグナル配列の特徴を持つアミノ酸配列が存在すること、  
5 (3) 多くの真核生物ではシグナル配列はアラニン-X-アラニン配列の次で切断されるが、ウミホタルのルシフェラーゼにおいてもアラニン-グルタミン酸-アラニン-プロリンの配列が存在すること等の理由により、第  
10 1図に示したウミホタル由来のルシフェラーゼのアミノ酸配列中の第29番目のアミノ酸であるプロリン(YP型)、第30番目のアミノ酸であるセリン(YN型)、第31番目のアミノ酸であるセリン(YS型)、第32番目のアミノ酸であるスレオニン(YT型)から始まる  
15 ルシフェラーゼ・タンパクを作製し、酵母のαフェロモンのシグナル配列の下流に連結するために、以下の10本のオリゴヌクレオチドを合成した。

	Y P - 1	5'-CCTTCAAGTACTCCA-3'
	Y P - 2	5'-CTGTTGGAGTACTTGAAGG-3'
	Y S - 1	5'-AGTACACCA-3'
	Y S - 2	5'-CTGTTGGTGTACT-3'
5	Y T - 1	5'-ACTCCA-3'
	Y T - 2	5'-CTGTTGGAGT-3'
	Y N - 1	5'-TCGTCGACACCA-3'
	Y N - 2	5'-CTGTTGGTGTGACGA-3'
	U - 1	5'-ACAGTCCCAACATCTTGTGAAGCTAAAGAAGGAG
10		AATGTAT-3'
	U - 2	5'-CGATACATTCTCCTTCTTAGCTTCACAAGATGT TGGGA-3'

15 合成オリゴヌクレオチド Y P - 2、 Y S - 2、 Y T -  
2、 Y N - 2、 U - 2 の 5 本については、 5' 末端を T  
4 DNA キナーゼによってリン酸化した。 すなわち、  
各オリゴヌクレオチド 300 pmol を 各々 20 μl の  
反応液 [ 50 mM トリス塩酸 (pH 7.6) / 10 mM  
20 塩化マグネシウム / 0.1 mM スペルミジン / 5 mM  
ジチオスレイトール / 0.1 mM EDTA ] 中で T4  
DNA キナーゼ ( 宝酒造社製 ) 10 ユニットを用いて、  
37 °C で 1 時間反応させ、 70 °C で 5 分間加熱した後、  
- 20 °C で保存した。

25 各オリゴヌクレオチドのアニーリングは次のように行

った。YP型ではYP-1、リン酸化したYP-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、YS型にはYS-1、リン酸化したYS-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、YT型にはYT-1、リン酸化したYT-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、YN型にはYN-1、リン酸化したYN-2、U-1、及びリン酸化したU-2を、各々50 pmolずつ混合し、70°Cで5分間加熱後、インキュベーターの電源を切り42°Cになるまで放置した。

10 実施例9

酵母αフェロモン遺伝子のプロモーターを有する発現ベクターpMFα8へのルシフェラーゼcDNAの挿入

ウミホタル・ルシフェラーゼcDNA中に存在する制限酵素C<sub>I</sub>aI切断部位に実施例8に示した合成オリゴマーを組み込み、5'末端にS<sub>t</sub>uI部位を持ち、N末端28、29、30、31個のアミノ酸を削ったルシフェラーゼcDNAを作製した。

酵母の発現ベクターpMFα8 [Gene 3, 155 (1985) : ATCC 37418]は、αフェロモン遺伝子のリーダー配列をコードする領域の直後を制限酵素S<sub>t</sub>uIで切断し、上述のルシフェラーゼcDNAを挿入した。作製した発現ベクターは、各々pMEF3A (YP型)、pMEF3B (YS型)、pMEF3C (YT型)、pMEF3D (YN型)と命名した(第25 4a図)。

作製した各々の発現ベクターの $\alpha$ フェロモン遺伝子／ルシフェラーゼcDNAの接続部位近傍の塩基配列は、ルシフェラーゼcDNA内の配列である5' - TATA AATGGTCCAAAGGA - 3' をプライマーとして、  
5 通常のジデオキシ法によって、正しく挿入されていることを確認した。pMFE3A、pMFE3B、pMFE  
3C、及びpMFE3Dにおける $\alpha$ フェロモン遺伝子／ルシフェラーゼcDNAの接続部位近傍の塩基配列、及びアミノ酸配列は第4b図に示した。

10 実施例10

酵母GAL1遺伝子のプロモーターを有する発現ベクタ－p103へのルシフェラーゼcDNAの挿入

実施例3で得たλCL07より、1. 3kb、0. 6  
15 kbの2つのEcoRI断片を各々プラスミドpUC1  
8にサブクローニングし、プラスミドpCL0712、  
pCL0742を作製した。pCL07(1μg)、及び  
pCL0712(1μg)をHindIIIとBglIIで  
切斷し、pCL07よりルシフェラーゼのN末端を含む  
20 DNA断片を、pCL0712よりルシフェラーゼのC  
末端を含むDNA断片を精製した。この2断片をプラス  
ミドpSPT18(ペーリンガー マンハイム社製)の  
HindIII部位にサブクローニングし、得られた組換え  
25 体プラスミドをpSTCL81と命名した。

次に、このpSTCL81(1μg)をBamHIで  
切斷し、クローニングした全cDNA配列をBamHI

断片として回収した。

一方、酵母の *GAL1* プロモーターを持つ発現ベクター  
— p103 [*Saccharomyces cerevisiae* の *GAL1* プロ  
モーター {Mol. Cell. Biol. 4, 144  
5 0 (1984)} の下流に、*Bam*H I 切断部位を含む  
ボリリンカーを持つ：大阪大学・原島 俊 助教授より  
供与された] 約 0.1 μg を *Bam*H I で切断し、T4  
DNA リガーゼを用いて前記の cDNA 断片約 0.1  
μg と連結し、*GAL1* プロモーターの下流にルシフェ  
10 ラーゼ cDNA の挿入された発現ベクター pGL1 を作  
製した（第5図）。

#### 実施例 11

##### 酵母によるウミホタル由来のルシフェラーゼの生産

実施例 9において作製した発現ベクター pMFE3A、  
15 pMFE3B、pMFE3C、pMFE3D 各々 10 μg をプロトプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)] によつて酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 20B-12 株 [Gene, 37, 155 (1985)] 株に導入した。

これらの形質転換体を 1 l の培養フラスコ中で 100 ml の YEPD 培地を用いて 30 °C で 3 日間培養した。培養途中及び培養終了後、培養液 5 ml を採取し、4 °C、10 分間、3,000 rpm で遠心して、その上清を集め培養上清とした。

25 また培養液 1 ml 分の菌体は 5 ml の滅菌蒸留水で洗

5 淨後、1 mlの50 mM リン酸ナトリウム(pH 7.5)／  
0. 1% Triton X-100に懸濁した。1 ml  
のガラス・ビーズ(直径0.45 mm)懸濁液を加え、  
0°Cで、時々ミキサーで激しく攪拌しながら5分間放置  
した。軽く遠心してガラス・ビーズを分離し、上清はさ  
らに1. 5 mlのエッペンドルフ チューブに移し、5  
分間、15,000 rpmで遠心した。この上清を菌体  
抽出液とした。

#### 実施例 1 2

10 酵母によるウミホタル由来のルシフェラーゼの生産

実施例 1 0 で作製した発現ベクター p GL 1 (10 μ  
g)は、実施例 1 1 と同様にプロトプラス法によって  
酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YSH2676株((a) *ura3-52*  
*leu2-3 leu2-112 trp1 pho3 pho5 his1-29*)株に導入し  
15 た。

この形質転換体を1 lの培養フラスコ中で100 ml  
の培地(1% 酵母エキス／2% ペプトン／2% ガ  
ラクトース)を用いて30°Cで2日間培養した。培養途  
中及び培養終了後、培養液5 mlを3,000 rpm、  
20 10分間、4°Cで遠心して、その上清を集め、培養上清  
とした。

また、菌体抽出液も実施例 1 1 と同様にして調製した。

#### 実施例 1 3

酵母により生産されたルシフェラーゼの活性測定

25 実施例 1 1 に示した培養上清中のルシフェラーゼ活性

の測定は、実施例7に記載した動物細胞の培養上清のルシフェラーゼ活性の測定と同様にして行い、その結果を第3表に示した。コントロールとして、pMF $\alpha$ 8を導入したS. cerevisiae 20B-12株の培養上清についても同様にして発生するフォトン数を計測した。

実施例11に示した酵母細胞中のルシフェラーゼ活性は、下記に記載した方法により行い、その結果も第3表に示した。すなわち、実施例11で作製した細胞抽出液10 $\mu$ lを290 $\mu$ lの上記測定用緩衝液と混合し、さらに2 $\mu$ lの33 $\mu$ M ウミホタル・ルシフェリンを混合し、培養上清の場合と同様にしてルシフェラーゼ活性を測定した。

第3表

15	プラスミド	ルシフェラーゼ活性 ( $\times 10^5$ cps/ml)				
		12時間	21時間	38時間	47時間	64時間
(a) pMFE3 A	菌体内	<0.01	<0.01	0.01	0.02	0.01
	菌体外	0.05	0.02	4.84	13.47	2.11
(b) pMFE3 B	菌体内	<0.01	<0.01	0.02	0.01	<0.01
	菌体外	0.06	0.20	6.22	2.73	1.02
(c) pMFE3 C	菌体内	<0.01	<0.01	0.02	0.01	0.01
	菌体外	0.10	0.21	2.76	0.79	0.89
(d) pMFE3 D	菌体内	<0.01	<0.01	0.02	0.01	0.01
	菌体外	0.06	0.21	3.97	0.76	1.02
(e) control	菌体内	<0.01	<0.01	<0.01	0.01	<0.01
	菌体外	0.06	0.04	0.05	0.06	0.11

## 実施例 14

酵母により生産されたルシフェラーゼの活性測定

実施例 12 に示した培養上清中のルシフェラーゼ活性の測定は、実施例 7 に記載した動物細胞の培養上清のルシフェラーゼ活性の測定と同様にして行い、その結果を第 4 表に示した。コントロールとして、p103 を導入した *S. cerevisiae* YSH2676 株の培養上清についても同様にして発生するフォトン数を計測した。

実施例 12 に示した酵母細胞中のルシフェラーゼ活性は、実施例 13 と同様にして行い、その結果を第 4 表に示した。

第 4 表

15	クローン N o.	ルシフェラーゼ活性 ( $\times 10^5$ cps/ml)		
		20時間	43時間	51時間
(a) No. 1	菌体内	0.06	0.07	0.07
	菌体外	0.53	7.28	7.71
(b) No. 2	菌体内	0.04	0.06	0.07
	菌体外	0.44	3.04	3.49
(c) No. 3	菌体内	0.07	0.07	0.06
	菌体外	0.40	3.00	4.70
(d) No. 4	菌体内	0.05	0.10	0.09
	菌体外	0.92	5.89	6.27
(e) No. 5	菌体内	0.06	0.08	0.05
	菌体外	0.50	2.52	2.47
(f) control	菌体内	0.01	n.t.	n.t.
	菌体外	0.08	0.13	0.03

## 実施例 15

大腸菌発現ベクター用オリゴヌクレオチドの合成とア  
ニーリング

大腸菌トリプトファン合成遺伝子 (trp) オペロン  
5 のプロモーターとSD配列の下流にメチオニン-プロリ  
ン (EP型)、メチオニン-セリン (ES型)、メチオ  
ニン-スレオニン (ET型) で開始される該ルシフェラ  
ーゼの発現ベクターを作製するために、以下の6本のオ  
リゴヌクレオチドを合成した。

10

EP - 1 5'-CGATGCCGTCAAGTACACCA-3'

EP - 2 5'-CTGTTGGTGTACTTGACGGCAT-3'

ES - 1 5'-CGATGAGTACACCA-3'

ES - 2 5'-CTGTTGGTGTACTCAT-3'

15

ET - 1 5'-CGATGACACCA-3'

ET - 2 5'-CTGTTGGTGTACAT-3'

合成オリゴヌクレオチドEP - 2、ES - 2、ET -  
20 2、及び実施例8のU - 2の各々300 pmolは、実  
施例8と同様にしてN末端をT4 DNAキナーゼを  
用いてリン酸化し、-20°Cで保存した。

各オリゴヌクレオチドは、EP型ではEP - 1、リン  
酸化したEP - 2、U - 1、及びリン酸化したU - 2を、  
ES型にはES - 1、リン酸化したES - 2、U - 1、  
25 及びリン酸化したU - 2を、ET型にはET - 1、リン

酸化したET-2、U-1、及びリン酸化したU-2を各々50pmolずつ混合し、実施例8と同様にしてアニーリングした。

#### 実施例16

5      大腸菌trpプロモーターを有する発現ベクターpMT1へのルシフェラーゼcDNAの挿入

大腸菌トリプトファンオペロン(*trp*)のプロモーター及びSD配列を持つ発現ベクターpMT-1 [pKM6(特開昭61-247387号)由来]は、制限酵素*Sma*I、*Cla*Iと*Pvu*IIで切断した。

一方、実施例3で作製した発現ベクターpCL07を*Sma*Iと*Cla*Iで切断し、*Cla*Iより下流のルシフェラーゼcDNAを含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により分離、精製した。

15      pMT-1の切断断片とpCL07の精製断片の各々0.1μgをT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)を用いて連結し、再び制限酵素*Sma*Iで切断した後、市販の大腸菌HB101コンピテント細胞(宝酒造社製)を形質転換し、プラスミドpMT-CL07を作製した。

20      このプラスミドは、*trp*プロモーター/SD配列の下流に*Cla*I部位より下流のルシフェラーゼcDNAを持つ。

このpMT-CL07を制限酵素*Cla*Iで切断し、その0.1μgと実施例15で作製した合成DNAの5μlとをT4 DNAリガーゼで連結し、*trp*プロモーターを有する発現ベクターpMT-CL07を得た。

ロモーター／SD配列の下流に、メチオニン-プロリン（EP型）、メチオニン-セリン（ES型）、メチオニン-スレオニン（ET型）で開始される該ルシフェラーゼ遺伝子を持つ発現ベクターを作製した。作製したプラスミドは各々、pMT-CLP、pMT-CLS、及びpMT-CLTと命名した。

作製した各々の発現ベクターのSD配列／ルシフェラーゼの接続部位近傍の塩基配列は、ルシフェラーゼcDNA内の配列である5' - TATAAAATGGTCCA  
AGGA - 3' をプライマーとして、通常のジデオキシ法によって、正しく挿入されていることを確認した。

pMT-CLP、pMT-CLS、pMT-CLTの制限酵素地図と確認した塩基配列を第6図に示す。

#### 実施例17

15 大腸菌によるウミホタル由来のルシフェラーゼの生産  
実施例16で作製した発現ベクターを用いて大腸菌HB101株を形質転換し、得られた形質転換体を5mlのL培地（アンピシリン：100mg/lを含む）で1晩、37°Cで静置培養した。翌日培養液の1mlを採取し、50mlの合成培地[2×M9-カザミノ酸培地（6g/l リン酸二水素カリウム/12g/l リン酸水素二ナトリウム/10g/l カザミノ酸/10g/l 塩化ナトリウム/1g/l 塩化アンモニウム/）/1mg/l 塩酸チアミン/250mg/l 硫酸マグネシウム/1% グルコース/100mg/l アン

ピシリン]に懸濁し、25°Cで1晩振盪培養した。翌朝、培養液にIAA(最終濃度20mg/l)とグルコース(最終濃度1%)を加え、12.5%のアンモニア水でpHを7.5に調整して、25°Cで3時間培養を続けた。

5 3時間後、IAA、グルコース、アンモニア水を同様にして加え、さらに3時間培養を続けた。培養終了後、培養液8mlを遠心して集菌し、菌体を0.5mlのTE緩衝液[10mMトリス塩酸(pH 8.0)/1mM EDTA]に懸濁した。42°Cの温水とドライアイス・アセトン液を用いて凍結融解を3回繰り返して溶菌後、10分間、10,000rpmで遠心し、その遠心上清を粗酵素液とした。

#### 実施例18

##### 大腸菌により生産されたルシフェラーゼの活性測定

15 実施例17で作製した粗酵素液中のルシフェラーゼ活性の測定は、下記に記載した方法によって行い、その結果を第5表に示した。すなわち、150μlの粗酵素液に150μlの前記測定用緩衝液、2μlの33μMウミホタル・ルシフェリンを混合し、発生するフォトン数を30秒間計測し、その結果を第5表に示した。コントロールとしてPMT-CLR(合成DNAが逆方向に挿入されたプラスミド)を導入した大腸菌HB101についても同様にして発生するフォトン数を計測した。

第5表

	プラスミド	ルシフェラーゼ活性 (c p s)
5	(a) pMT-CLP	1200
	(b) pMT-CLS	870
	(c) pMT-CLT	540
	(d) pMT-CLR (control)	200

## 産業上の利用可能性

ウミホタル由来のルシフェラーゼは非常に発光強度の  
15 強い発光系であり、抗体分子を本酵素と結合させて E I A (酵素抗体アッセイ法)に、また、DNA/RNA 分子と本酵素とを結合させて DNA プローブ法に利用するなど、各種検査法への利用が期待できる。

本発明によって、ウミホタル由来のルシフェラーゼを  
20 コードする cDNA の 1 次構造が特定され、同時に該ルシフェラーゼの 1 次構造が明らかになった。さらに、本発明にあるルシフェラーゼの発現ベクターを持つ動物細胞、酵母、大腸菌の大量培養により、該ルシフェラーゼを安定的に生産させる方法が開かれ、該ルシフェラーゼを安価で大量に得ることができるようになるものと期待  
25

41

される。

また、プロテイン・エンジニアリングの手法を用いて、該ルシフェラーゼの安定性の増加、発光量子収率の改善、発光条件の改善、発光波長の変更等を行う方法が開かれ

5 た。

10

15

20

25

## 請求の範囲

- (1) 第1図に示す1番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- 5 (2) 第1図に示す29番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- (3) 第1図に示す30番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- 10 (4) 第1図に示す31番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- (5) 第1図に示す32番目から555番目に至るアミノ酸配列を有する純化されたルシフェラーゼ及びその同効物。
- 15 (6) 請求の範囲第1～5項記載のルシフェラーゼまたはその同効物をコードする遺伝子。
- (7) 第1図に示す塩基配列である請求の範囲第6項記載の遺伝子。
- 20 (8) 宿主細胞中で発現可能なプロモーターの下流に請求の範囲第6項記載の遺伝子を連結してなる組換え体ベクターD N A。
- (9) 大腸菌中で発現可能なプロモーター及びS D配列の下流に請求の範囲第6項記載の遺伝子を連結して
- 25

43

なる組換え体ベクターD N A。

(10) 請求の範囲第8または9項記載のベクターD N Aにより宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

5 (11) 宿主細胞が動物細胞、酵母及び大腸菌からなる群から選ばれた1種である請求の範囲第10項記載の形質転換体。

(12) 請求の範囲第10または11項記載の形質転換体を培養することを特徴とするルシフェラーゼの生  
10 産方法。

15

20

25

1/9

## 第1a図

Met Lys Leu Ile Ile Leu Ser Ile Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Val Asn Cys Gln Asp  
 ATG AAG CTA ATA ATT CTG TCT ATT ATA TTG GCC TAC TGT GTC ACA GTC AAC TGC CAG GAT  
 10 20 30 40 50 60

Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Ala Pro Ser Ser Thr Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu  
 GCA TGT CCT GTA GAA GCT GAA GCA CCG TCA AGT ACA CCA ACA GTC CCA ACA TCT TGT GAA  
 70 80 90 100 110 120

Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser  
 GCT AAA GAA GGA GAA TGT ATC GAT ACC AGA TGC GCA ACA TGT AAA CGA GAC ATA CTA TCA  
 130 140 150 160 170 180

Asp Gly Leu Cys Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile  
 GAC GGA CTG TGT GAA AAT AAA CCA GGG AAG ACA TGC TGT AGA ATG TGC CAG TAT GTA ATI  
 190 200 210 220 230 240

Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys Arg Phe Asn Phe  
 GAA TGC AGA GTA GAA GCT GCT GGA TAT TTT AGA ACG TTT TAC GGC AAA AGA TTT AAT TTT  
 250 260 270 280 290 300

Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr Lys Gly Gly Asp Trp Ser Val Thr  
 CAG GAA CCT GGT AAA TAT GTG CTG GCT CGA GGA ACC AAG GGT GGC GAC TGG TCT GTA ACC  
 310 320 330 340 350 360

Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu  
 CTC ACC ATG GAG AAT CTA GAT GGA CAG AAG GGA GCT GTA CTG ACT AAG ACA ACA CTG GAG  
 370 380 390 400 410 420

Val Val Gly Asp Val Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly  
 GTA GTA GGA GAC GTA ATA GAC ATT ACT CAA GCT ACT GCA GAT CCT ATC ACA GTT AAC GGA  
 430 440 450 460 470 480

2 / 9

第1b図

Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr Ile Ala Val Val	170	180
GGA GCT GAC CCA GTT ATC GCT AAC CCG TTC ACA ATT GGT GAG GTG ACC ATT GCT GTT GTC		
490            500            510            520            530            540		
Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile	190	200
GAA ATA CCC GGC TTC AAT ATT ACA GTC ATC GAA TTC TTT AAA CTA ATC GTG ATT GAT ATT		
550            560            570            580            590            600		
Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly	210	220
CTG GGA GGA AGA TCT GTG AGA ATT GCT CCA GAC ACA GCA AAC AAA GGA CTG ATA TCT GGT		
610            620            630            640            650            660		
Ile Cys Gly Asn Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr Asp Ala Asp Gln Leu	230	240
ATC TGT GGT AAT CTG GAG ATG AAT GAC GCT GAT GAC TTT ACT ACA GAC GCA GAT CAG CTG		
670            680            690            700            710            720		
Ala Ile Gln Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr Gly Asn Pro Ser	250	260
GCG ATC CAA CCC AAC ATA AAC AAA GAG TTC GAC GGC TGC CCA TTC TAC GGG AAT CCT TCT		
730            740            750            760            770            780		
Asp Ile Glu Tyr Cys Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile	270	280
GAT ATC GAA TAC TGC AAA GGT CTC ATG GAG CCA TAC AGA GCT GTA TGT CGT AAC AAT ATC		
790            800            810            820            830            840		
Asn Phe Tyr Tyr Tyr Thr Leu Ser Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met Gly Gly Glu Glu Arg	290	300
AAC TTC TAC TAT TAC ACT CTG TCC TGC GCC TTC GCT TAC TGT ATG GGA GGA GAA GAA AGA		
850            860            870            880            890            900		
Ala Lys His Val Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr	310	320
GCT AAA CAC GTC CTT TTC GAC TAT GTT GAG ACA TGC GCT GCA CCG GAA ACG AGA GGA ACG		
910            920            930            940            950            960		

3 / 9

### 第1c図

330		340			
Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg Tyr Gln Phe Gln					
TGT GTT TTA TCA GGA CAT ACT TTC TAT GAC ACA TTC GAC AAA GCC AGA TAT CAA TTC CAG					
970	980	990	1000	1010	1020

1030	1040	1050	1060	1070	1080
350					
360					
<b>Gly Pro Cys Lys Glu Leu Leu Met Ala Ala Asp Cys Tyr Trp Asn Thr Trp Asp Val Lys</b> <b>GGC CCA TGC AAA GAG CTT CTG ATG GCC GCA GAC TGT TAC TGG AAC ACA TGG GAT GTA AAG</b>					

Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly Asp Ile Leu Thr	410	420			
TCT ATC CCG TAC AGT TCT GAG AAC ACA TCC ATA TAC TGG CAG GAT GGA GAC ATC CTG ACG					
1210	1220	1230	1240	1250	1260

430	440				
Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val					
ACG GCC ATC CTA CCT GAA GCT CTT GTC GTT AAG TTC AAC TTT AAG CAG CTC CTT GTA GTT					
1270	1280	1290	1300	1310	1320

Ser Thr Asp Asp Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr Pro Asn Pro Pro Gly	470	480			
TCA ACT GAT GAT TTC TTT GAC GCA GAA GGA GCA TGC GCT CTG ACC CCC AAT CCC CCA GGA					
1390	1400'	1410	1420	1430	1440

4 / 9

第1d図

		490			500
Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Ser Leu Phe Asp Ser Ser	TGT ACA GAG GAG CAG AAA CCA GAA GCT GAG CGA CTC TGC AAT AGT CTA TTT GAT AGT TCT				
1450	1460	1470	1480	1490	1500

510	520				
Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu					
ATC GAC GAG AAA TGT AAT GTC TGC TAC AAG CCT GAC CGT ATT GCA CGA TGT ATG TAC GAG					
1510	1520	1530	1540	1550	1560

530	540				
Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys					
TAT TGC CTG AGG GGA CAG CAA GGA TTC TGT GAC CAT GCT TGG GAG TTC AAA AAA GAA TGC					
1570	1580	1590	1600	1610	1620

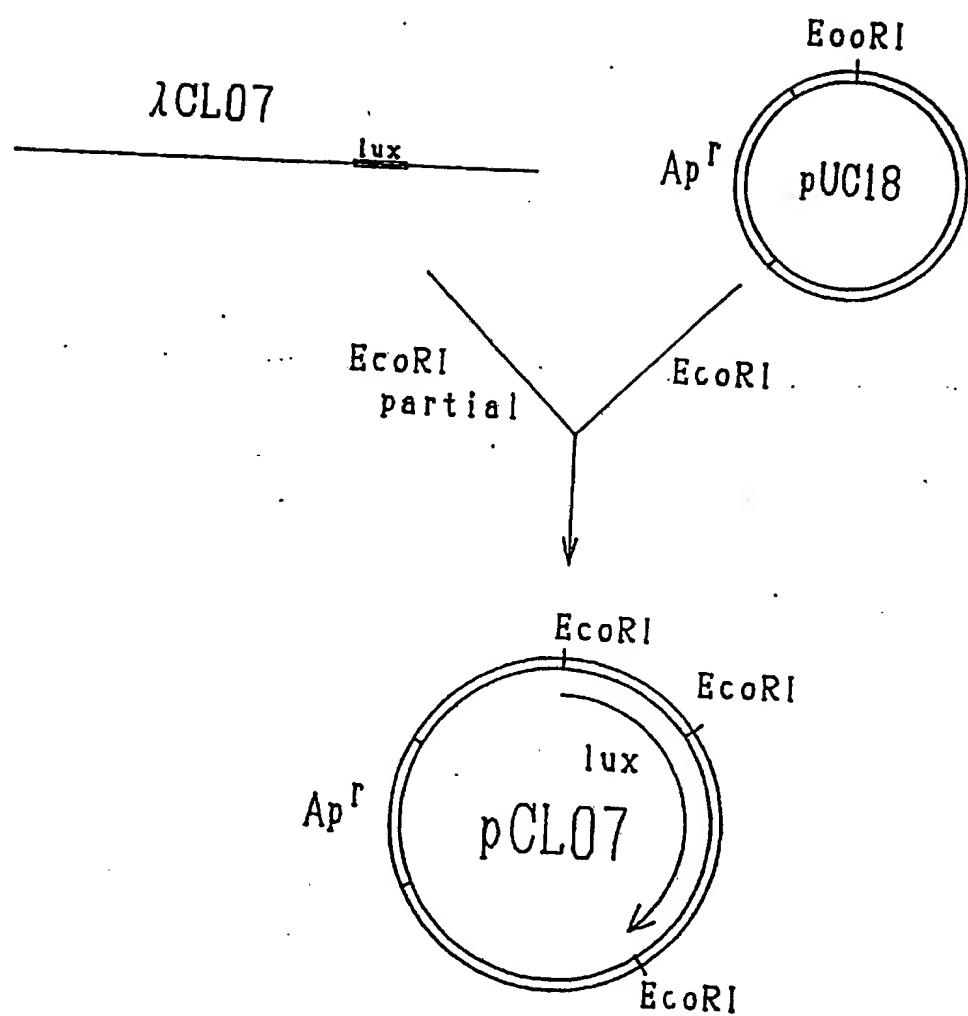
550	555				
Tyr Ile Lys His Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln ***					
TAC ATA AAG CAT GGA GAC ACT CTA GAA GTA CCA CCT GAA TGC CAA TAAATGAAACAAAGATAACAG					
1630	1640	1650	1660	1670	1680

AAGCTAAGACTACTACAGCAGAAGATAAAAGAGAAGCTGTAGTTCTCAAAAACAGTATATTGATGTACTCATTTGTT  
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760

1770      1780      1790      1800      1810      1820  
TAC TTACATAAAAATAAATTGT TATTATCATAACGTAAGAAAAA AAAAAAA

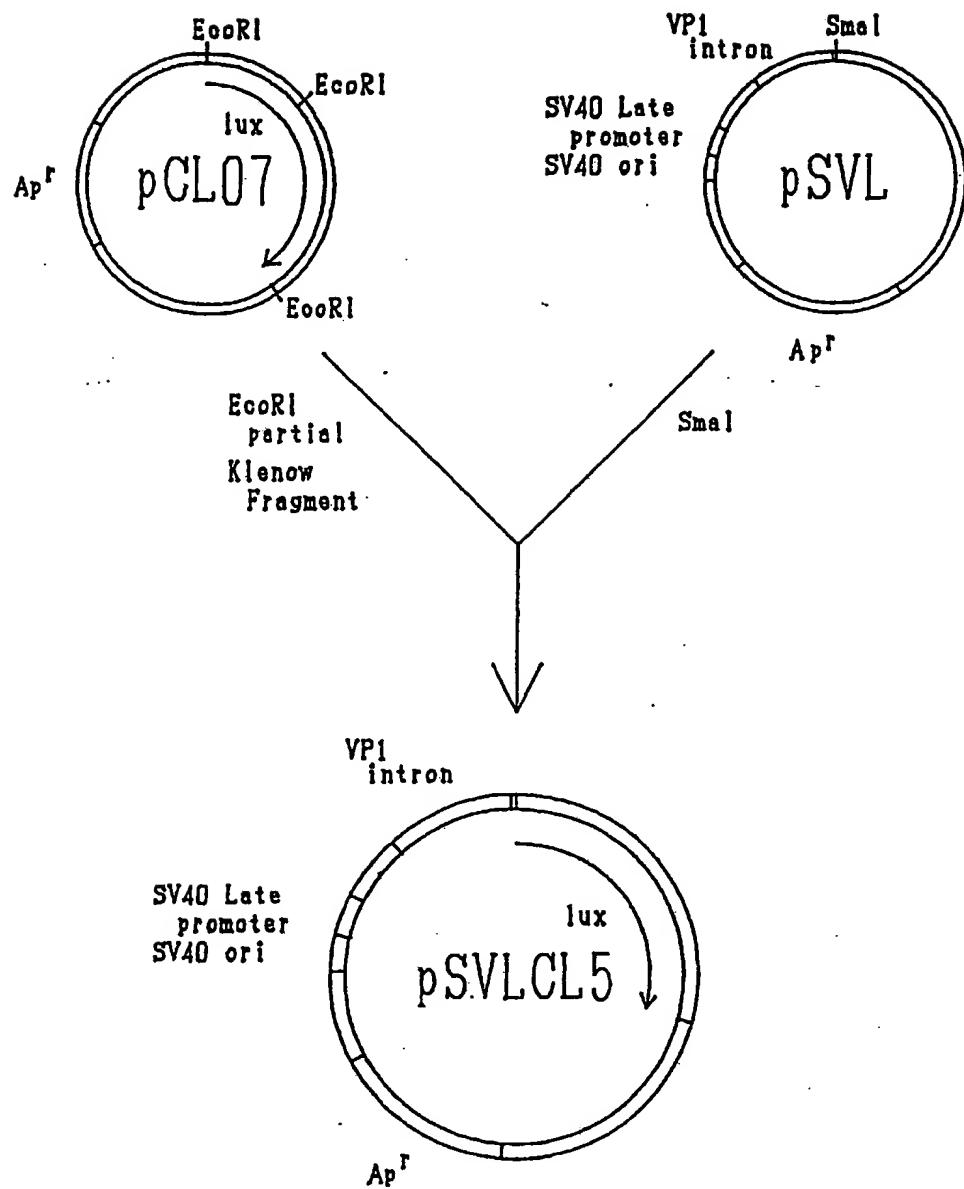
5/9

## 第2図



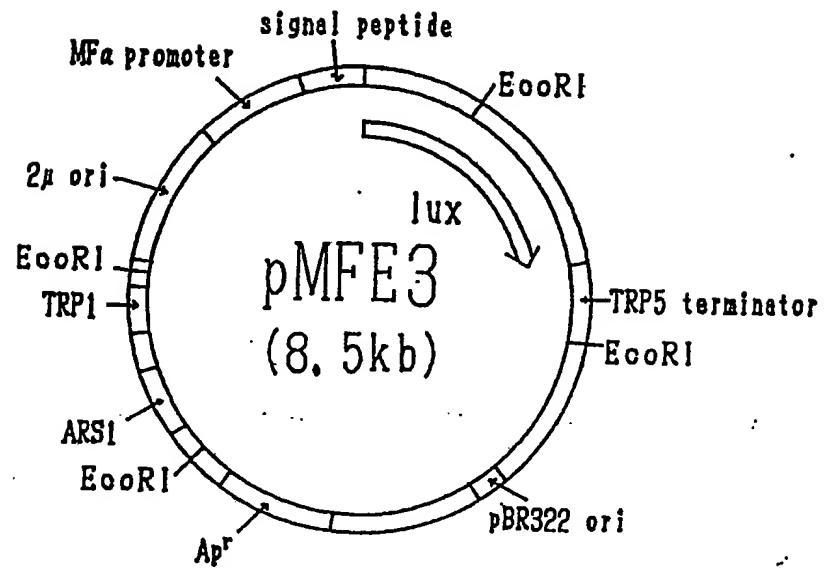
6 / 9

## 第3図



7 / 9

第4 a図

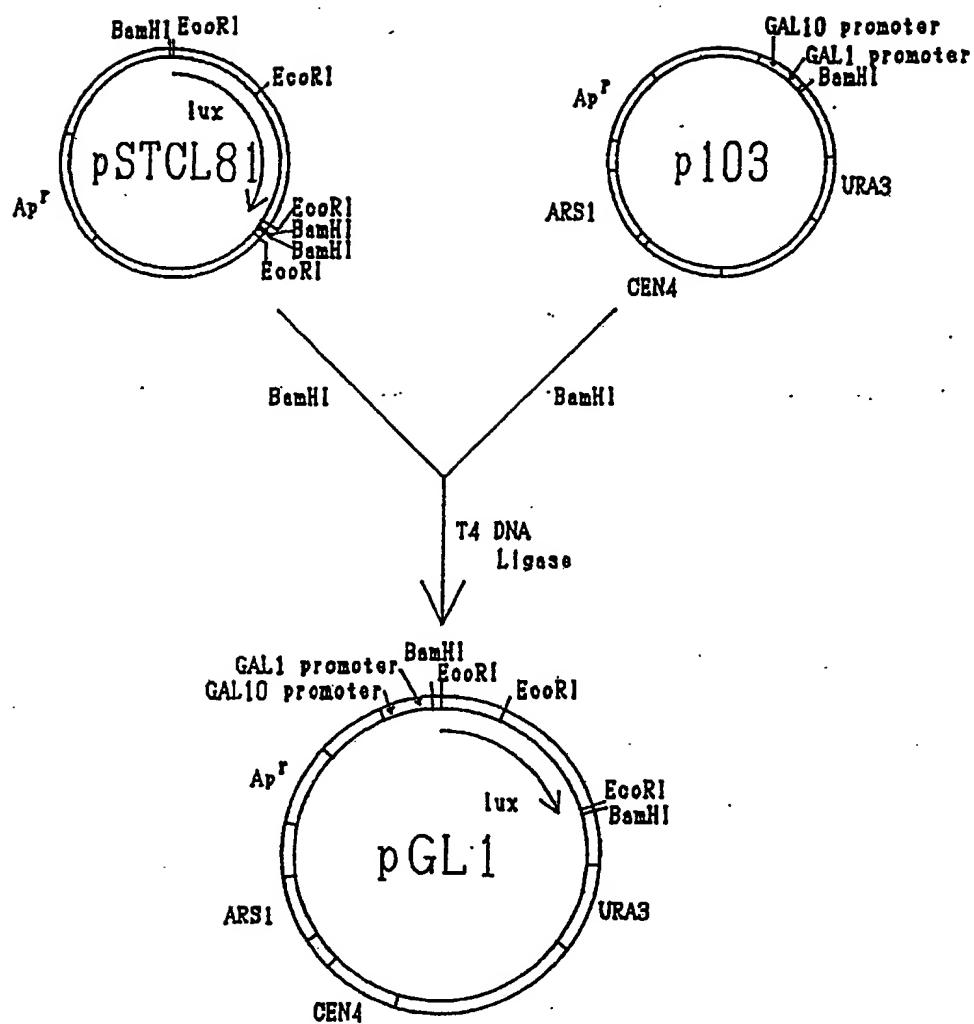


第4 b図

		29	30	31	32	33	
(a) pMFE3A		Met	....	Lys Arg Pro Ser Ser Thr Pro	...		
(b) pMFE3B		Met	....	Lys Arg --- --- Ser Thr Pro	...		
(c) pMFE3C		Met	....	Lys Arg --- --- --- Thr Pro	...		
(d) pMFE3D		Met	....	Lys Arg --- Ser Ser Thr Pro	...		

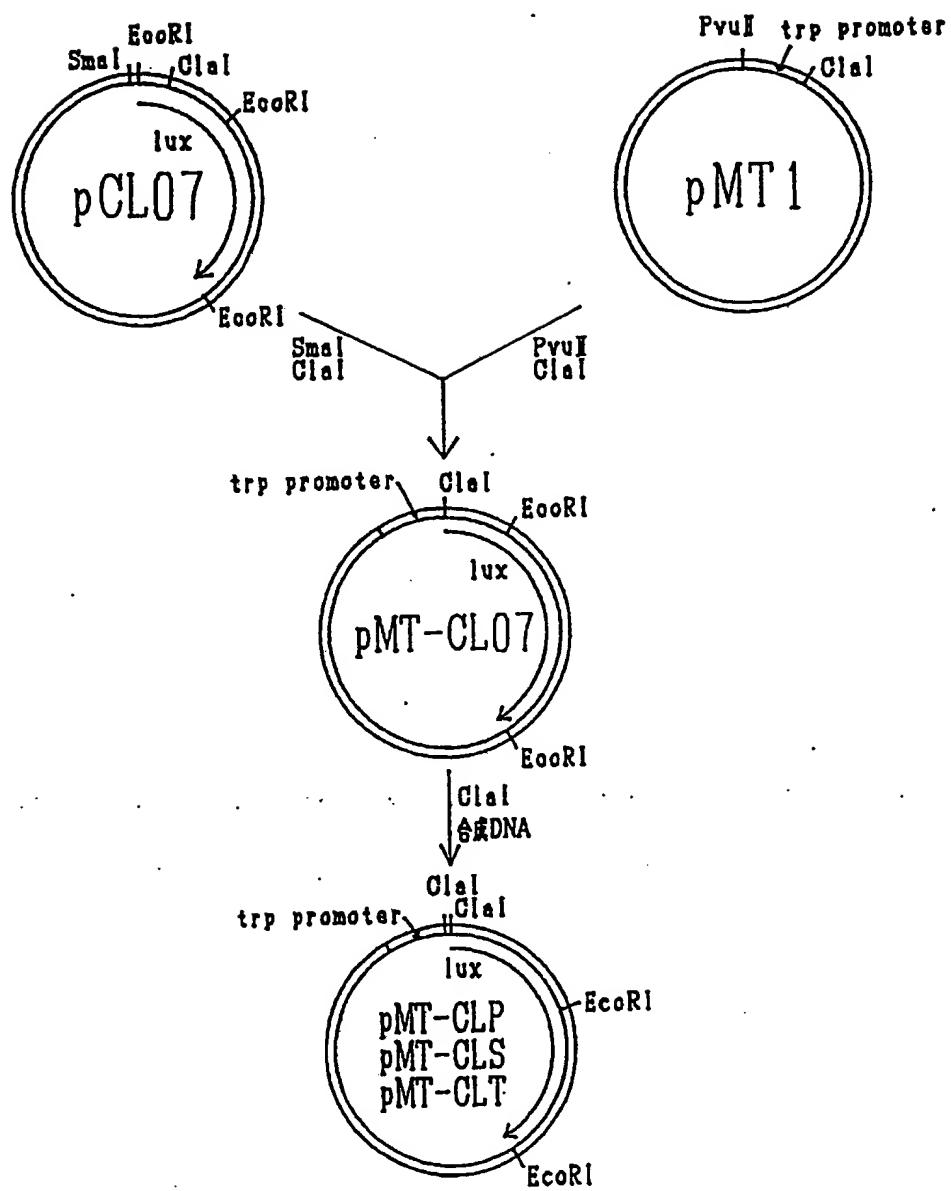
8 / 9

## 第5図



9 / 9

第6図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/00811

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>10</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl <sup>4</sup> C12N9/02, C12N15/00		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System   Classification Symbols		
IPC	C12N9/02, C12N15/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
COMPUTER SEARCH (CHEMICAL ABSTRACTS, BIOSIS DATABASES, EMBL-GDB, LASL-GDB AND NBRF-PDB)		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup>		
Category <sup>11</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X, Y	BIOCHEMISTRY, Vol. 13, No. 25, (1974), F.I.Tsuji, et al [Some Properties of Luciferase from the Bioluminescent Crustacean, Cypridina hi/gendorfii] P. 5204 - 5209	1 - 5
A	SCIENCE, Vol. 234, No. 4778, (1986), D.W.Ow, et al [Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants] P. 856 - 859	6 - 12
A	WO, A1, 88/00617 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH, INC.) 28 January 1988 (28. 01. 88)	6 - 12
<p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"S" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
September 18, 1989 (18. 09. 89)	October 2, 1989 (02. 10. 89)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

## 国際調査報告

国際出願番号PCT/JP 89/00811

<b>I. 発明の属する分野の分類</b>		
国際特許分類(IPC) Int. Cl. C12N9/02, C12N15/00		
<b>II. 国際調査を行った分野</b>		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12N9/02, C12N15/00	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
COMPUTER SEARCH(CHEMICAL ABSTRACTS, BIOSIS DATABASES EMBL-GDB, LASL-GDB AND NBRF-PDB)		
<b>III. 関連する技術に関する文献</b>		
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X, Y	BIOCHEMISTRY, 第13巻, 第25号, (1974) F.I.Tsuji, et al 「Some Properties of Luciferase from the Bioluminescent Crustacean Cypridina higendorfii」 P.5204-5209	1-5
A	SCIENCE, 第234巻, 第4778号, (1986), D.W.Ow, et al 「Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants」 P.856-859	6-12
A	WO, A1, 88/00617 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH, INC.) 28. 1月. 1988 (28. 01. 88)	6-12
※引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日に公表された文献		
「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パントファミリーの文献		
<b>IV. 認 証</b>		
国際調査を完了した日  18. 09. 89	国際調査報告の発送日  02.10.89	
国際調査機関  日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員  特許庁審査官 平田和男	4B 7823